



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0146437
(43) 공개일자 2022년11월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/87 (2006.01) *A61K 47/62* (2017.01)
A61K 47/69 (2017.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) *B82Y 5/00* (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/87 (2013.01)
A61K 47/62 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2022-7027346
- (22) 출원일자(국제) 2021년01월08일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년08월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/012820
- (87) 국제공개번호 WO 2021/142355
 국제공개일자 2021년07월15일
- (30) 우선권주장
 62/959,790 2020년01월10일 미국(US)
 62/960,626 2020년01월13일 미국(US)

- (71) 출원인
아프리카안 안드라닉 앤드류
 미국, 워싱턴 98103, 시애틀, 454 엔. 34 스트리트, 씨/오 스템제닉스, 인코포레이티드
- (72) 발명자
아프리카안 안드라닉 앤드류
 미국, 워싱턴 98103, 시애틀, 454 엔. 34 스트리트, 씨/오 스템제닉스, 인코포레이티드
- (74) 대리인
특허법인한얼

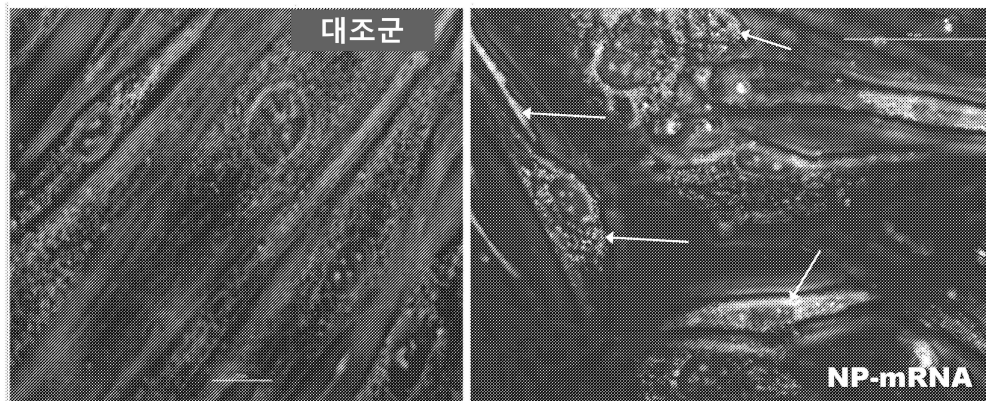
전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 **목적 유전자의 발현 및/또는 신호전달 경로의 조절을 위한 나노입자**

(57) 요약

본 개시는 기능적 발현 및/또는 활성을 위해 RNA 작제물을 세포에 전달하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본 개시는 다관능화된 나노입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 다관능화된 나노입자는 적어도 하나의 RNA 분자, 적어도 하나의 세포 투과성 펩티드(CPP), 및 적어도 하나의 양으로 하전된 모이어티로 관능화된 코어를 포함하고, 이들 각각은 임의로 링커 모이어티로 코어에 독립적으로 부착된다. 일부 실시양태에서, RNA 분자는 코어에 부착된 링커 모이어티에 부착된 5' 말단을 갖는 캡핑되지 않은 mRNA 분자이다. 다관능화된 나노입자는 실질적으로 중성, 음 또는 양으로 하전되어 있다. 다관능화된 나노입자는 백신접종, 암 치료, 텔로미어의 신장, 세포 신호전달 경로의 변형 등을 포함하는 다양한 목적을 위해 세포에서 목적 폴리펩티드를 전달 및 발현시키는 방법에 사용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/6929 (2017.08)

A61K 48/0041 (2013.01)

C12N 15/111 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

C12N 9/1276 (2013.01)

B82Y 5/00 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2320/32 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

제1 링커(linker)에 의해 고체 나노입자 코어(solid nanoparticle core)에 부착된 적어도 하나의 RNA 분자, 상기 고체 나노입자 코어에 부착된 적어도 하나의 세포 투과성 펩티드(CPP), 및 상기 고체 나노입자 코어에 연결된 적어도 하나의 양으로 하전된 모이어티(moiety)에 의해 관능화된(functionalized) 고체 나노입자 코어를 포함하는 조성물로서, 상기 관능화된 나노입자는 실질적으로 중성으로 하전되거나, 음 또는 양으로 하전되어 있는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 고체 나노입자 코어가 금속성 또는 비금속성인, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 나노입자 코어가 초상자성(superparamagnetic)인, 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 고체 나노입자 코어가 철, 금, 또는 상기 기재된 바와 같은 다른 금속을 포함하는, 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고체 나노입자 코어가 직경 50nm 이하의 크기를 갖는, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 RNA 분자가 5' 말단 및 3' 말단을 갖는 캡핑되지 않은(uncapped) mRNA 분자이고, 캡핑되지 않은 mRNA 분자의 5' 말단은 제1 링커에 공유 결합되는, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 RNA 분자가 5' 말단 및 3' 말단을 갖는 캡핑된 mRNA 분자이고, 상기 캡핑된 mRNA 분자의 3' 말단은 제1 링커에 공유 결합되는, 조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 mRNA 분자의 길이가 적어도 약 150 뉴클레오티드인, 조성물.

청구항 9

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 mRNA 분자가 목적 항원을 코딩하는(encoding), 조성물.

청구항 10

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 mRNA 분자가 목적 효소를 코딩하는, 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 mRNA 분자가 텔로머라제를 코딩하는, 조성물.

청구항 12

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 mRNA 분자가 검출가능한 단백질 마커를 코딩하는, 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 제1 링커가 선형 링커인, 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 제1 링커가 고체 나노입자 코어에 대한 단일 접촉점, 및 복수의 분지(branch)를 갖는 분지 링커이고, 복수의 분지 중 적어도 2개가 개별 RNA 분자에 부착되어 있는, 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 제1 링커의 길이가 적어도 6 옹스트롬(\AA)인, 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 제1 링커가 절단가능한 링커인, 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 절단가능한 링커가 세포 내에서 절단되도록 구성되는, 조성물.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 절단가능한 링커가 디설파이드 결합을 포함하는, 조성물.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단가능한 링커가 산 불안정성(acid labile) 링커 또는 다른 유형의 링커인, 조성물.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 CPP가 제2 링커에 의해 고체 나노입자 코어에 부착되고, 상기 제1 링커 및 제2 링커가 동일하거나 상이한, 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 제1 링커 및 제2 링커가 상이하고, 상기 제2 링커가 제1 링커보다 더 긴, 조성물.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 양으로 하전된 모이어티가 제3 링커에 의해 고체 나노입자 코어에 부착되고, 상기 제1 링커와 제3 링커가 동일하거나 상이한, 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 제1 링커 및 제3 링커가 상이하고, 상기 제3 링커가 제1 링커보다 더 긴, 조성물.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 양으로 하전된 모이어티가 하전된 펩티드인, 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 하전된 펩티드가 2개 이상의 양으로 하전된 아미노산을 함유하는, 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고체 나노입자 코어가 복수의 mRNA 또는 siRNA 분자, 및 이것에 약 100:1 내지 약 1:10의 비율로 부착된 복수의 양으로 하전된 모이어티를 갖는, 조성물.

청구항 27

제1항에 있어서, 상기 조성물이 고체 나노입자 코어에 부착된 적어도 2개의 mRNA 분자를 포함하고, 상기 mRNA 분자가 동일하거나 상이할 수 있고, mRNA 분자의 적어도 하나가 5' 말단 및 3' 말단을 갖는 캡핑되지 않은 (uncapped) mRNA 분자이고, 상기 캡핑되지 않은 mRNA 분자의 5' 말단이 제1 링커에 공유 결합되는, 조성물.

청구항 28

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 CPP가 5 내지 9개의 염기성 아미노산을 포함하는, 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 적어도 하나의 CPP가 5 내지 9개의 연속 염기성 아미노산을 포함하는, 조성물.

청구항 30

제1항에 있어서, 고체 나노입자 코어에 부착된 적어도 하나의 siRNA 분자를 추가로 포함하고, 상기 적어도 하나의 siRNA 분자가 목적 유전자에 특이적인, 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 고체 나노포어(nanopore) 코어에 부착된 2개 이상의 상이한 siRNA 분자를 추가로 포함하고, 상기 2개 이상의 siRNA 분자 각각은 상이한 목적 유전자 또는 목적 유전자 내의 상이한 서열에 특이적인, 조성물.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 상기 siRNA 분자 및 RNA 분자가 약 1:20 내지 약 20:1의 비율로 존재하는, 조성물.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 기재된 관능화된 나노입자를 포함하는 세포.

청구항 34

세포에서 목적 폴리펩티드를 발현시키는 방법으로서,

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 세포에 전달하고, RNA 분자의 발현을 가능하게 하는 것을 포함하고, 상기 RNA 분자가 목적 폴리펩티드를 코딩하는, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 항원인, 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 효소인, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 효소가 텔로머라제인, 방법.

청구항 38

제34항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 검출가능한 마커 또는 구조 단백질인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2020년 1월 10일에 출원된 미국 가출원 제62/959,790호 및 2020년 1월 13일에 출원된 미국 가출원 제 62/960626호의 이익을 주장하고, 이들 각각은 참조에 의해 그 전체가 본 명세서에 명시적으로 편입된다.
- [0003] 발명의 분야
- [0004] 본 개시는, 펩티드, 단백질, 작은 간섭 RNA(siRNA) 등의 작은 RNA 및 메신저(messenger) RNA(mRNA) 등의 긴 RNA 분자를 포함하지만 이들로 한정되지 않는 생물활성 분자로 관능화된(functionalized) 나노입자(nanoparticle)를 사용하여 유전자 발현 및 유전자 산물(gene product)의 활성을 제어하기 위한 조성물 및 이를 사용 및 제조하는 관련 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 통상 증식하고 이동하고 다양한 세포 유형으로 분화하는 세포의 능력은 배발생 및 심혈관, 면역, 장 및 뇌 시스템의 세포를 포함하지만 이들로 한정되지 않는 성숙 세포의 기능에 중요하다. 세포의 이러한 기능적 능력은 후천적 또는 유전된 돌연변이로 인해 다양한 병적 상태에서 변화하고, 이는 상이한 세포내 신호전달 경로의 활성화 및 다양한 유전자(예: 종양유전자)의 과발현을 유도할 수 있으며, 각각은 악성 형질전환, 악성 세포의 과증식(hyperproliferation) 및 확장에 기여할 수 있다.
- [0006] 또한, 과증식은 세포의 정상 기능에 필요한 일부 중요한 유전자(예: 종양 억제 유전자) 발현의 비정상적 소실에 의해 유발될 수 있고, 이러한 기능 소실은 악성 형질전환 및 다양한 종양 및 암의 발증을 유도할 수 있다.
- [0007] 또한, 바이러스 감염 중, 신규한 및/또는 변경된 유전자(바이러스 기원 또는 바이러스 DNA의 숙주 세포 게놈 내로의 통합에 의해 유발되거나 바이러스 RNA로부터 발현되는 신규한 돌연변이의 산물)가 세포 내에서 발현되고, 바이러스 복제를 보조하고, 이는 다양한 중증 및 종종 생명을 위협하는 합병증을 유발할 수 있다. 면역계는 종종 일부 바이러스 감염과 싸우는 데 효과적이지만, 백신접종(vaccination)은 생물이 보다 효과적으로 감염에 저항하고 싸울 수 있도록 준비하기 위해 전 세계적으로 일반적으로 사용되는 접근법이다. 그러나, 백신접종은 DNA를 포함하는 부분적 또는 완전히 불활성화된 바이러스의 사용에 기반하는 경우가 많다. 외인성 DNA가 세포와 함께 사용될 때마다, 이러한 DNA는 세포 게놈에 통합되고, 종양 형성 및/또는 기타 유해한 결과를 유발할 수 있다. 따라서, 세포 게놈을 완전히 온전하게 보존하는 단백질 또는 mRNA를 사용하는 비-DNA-기반 백신접종은 훨씬 더 바람직한 백신접종 경로를 나타낸다.
- [0008] 최근의 과학적 발전은 외인성 소분자 억제제, 작은 간섭 RNA(siRNA), miRNA 또는 메신저 RNA(mRNA)의 투여를 도입하는 종양유전자-유사 분자의 비정상적 발현을 제어하기 위한 다양한 접근법을 제시한다. 또한, 바이러스 유전자-특이적 mRNA를 백신접종에 사용하여, 바이러스 유전자 산물의 발현을 유도하고, 면역계의 세포를 훈련시켜 바이러스에 대한 항체를 생성할 수 있다. 그럼에도 불구하고, siRNA, miRNA, mRNA 및 기타 RNA-기반 분자의 효과적 사용에 대한 주요 장벽은 세포막을 통해 다양한 인간 세포의 세포질로 siRNA를 수송할 수 있는 고효율의 전달 비히클의 결여이다. 동일한 문제는 또한, 악성 형질전환 및 종양 형성 동안 이의 발현이 소실되는 유전자(들)의 회복을 방해한다.
- [0009] 따라서, 당해 기술분야의 발전에도 불구하고, 유전자 발현의 조절을 효과적으로 유도하기 위해, 생물학적 활성 분자를 단독으로 또는 다양한 조합으로 세포 내부로 전달하기 위한 효율적 접근법에 대한 필요성이 남아 있다. 예를 들면, 염색체 구조에 대한 손상을 회피하면서, 하나 이상의 상이한 비정상 신호전달 경로를 표적화하고/하거나 다양한 세포에서 목적의 표적 유전자(들)의 발현을 유도할 필요성이 남아 있다. 본 개시는 이들 및 관련된 요구에 대처한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0010] 일부 양태에서, 본 개시는 세포 기능을 조절하기 위해, 단백질, 펩티드, siRNA, 마이크로RNA 및 mRNA를 생체적합 나노입자(biocompatible nanoparticle)에 연결(linking)하는 관능화 및 제조 방법을 제공한다. 일부 양태

에서, 본 개시는 다관능화된(multi-functionalized) 생체적합성 나노입자 자체에 관한 것이다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시는, 개시된 다관능화된 생체적합성 나노입자를 사용하는 방법에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 개시는 다관능화된 나노입자, 및 이를 포함하는 조성물, 키트, 및 세포를 제공한다.

[0011] 본 개시의 이들 및 기타 양태는, 첨부 도면과 함께 이하의 상세한 설명을 참조하면, 당업자에게 보다 용이하게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 본 발명의 기술한 양태 및 부수하는 다수의 이점은 첨부된 도면과 함께 해석되는 경우, 이하의 상세한 설명을 참조함으로써 동일한 것이 더 잘 이해됨에 따라 더 용이하게 이해될 것이다.

도 1은 인간 1차 섬유아세포의 2개의 사진을 나타내고, 이는 본 개시의 예시적 다관능화된 나노입자가 1차 세포에서 유전자 특이적 siRNA 분자의 세포질 전달에서 매우 효율적인 것을 입증한다. 좌측 패널은 siRNA를 포함하지 않는 나노입자로 처리된 대조군 인간 1차 섬유아세포를 나타낸다. 우측 패널은, 중앙 억제 유전자 *PTIO*를 표적화하는 생물활성 펩티드 및 siRNA 작제물(construct)로 다관능화된 FITC-표지 나노입자로 처리되고, 이어서 결합되지 않은 나노입자를 제거하기 위해 광범위하게 세척된 인간 1차 섬유아세포를 나타낸다. 세포 핵은 DAPI로 염색했다. 표시된 형광(예시적 형광 신호를 나타내는 화살표 참조)은 qRT-PCR에 의해 결정된 바와 같이 표적 *PTIO* 유전자 발현을 60% 녹다운시키는 세포 세포질에서 PTEN-특이적 siRNA-관능화된 나노입자의 존재를 입증한다.

도 2는 인간 1차 섬유아세포의 2개의 사진을 나타내고, 이는 본 개시의 예시적 다관능화된 나노입자가 세포 내의 mRNA의 전달 및 번역에서 매우 효율적인 것을 입증한다. 좌측 패널은 mRNA를 포함하지 않는 나노입자에 노출된 대조군 인간 1차 섬유아세포를 나타낸다. 우측 패널은 적색 mCherry 단백질을 코딩하는(encoding) 캡핑되지 않은(uncapped) mRNA로 관능화된 NP로 처리된 세포를 나타낸다. 적색 형광(예시적 형광 신호를 나타내는 화살표 참조)에 의해 결정된 mCherry mRNA 발현은 처리 26시간 후에 평가했다. 표시된 형광은 다관능화된 나노입자에 의해 전달된 캡핑되지 않은 mRNA를 포함하는 mRNA가 mRNA 페이로드(payload)의 효율적 번역을 성공적으로 초래할 수 있음을 확인한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 개시는 siRNA, miRNA, mRNA, 펩티드 및 단백질을 포함하는 다양한 기원의 하나 이상의 생물활성 분자의 다양한 세포 유형으로의 비통합적 전달을 효과적으로 촉진하는 효율적 나노입자-기반 전달 메커니즘에 대한 본 발명자의 개발에 기초한다. RNA 작제물은 높은 기능성을 나타내고 무손상 세포 게놈(intact cell genome)을 보존한다. 이 플랫폼은 복수의 생물활성 페이로드로 다중화되어, 예를 들면, 복수의 경로를 동시에 표적화할 수 있고, 표적 유전자 발현의 고효율적 조절을 위한 신규한 접근법을 제공한다. 이 플랫폼은 강화된 백신접종을 실시하고, 텔로미어 신장(telomere expansion)을 촉진하고, 인간 악성종양을 효과적으로 치료하고, 다양한 병적 상태를 유발하는 유전자의 발현을 제어하는 등의 다양한 응용 분야에 적용될 수 있다.

[0014] 생물학적 활성 분자를 세포 내로 전달하기 위해, 본 개시는 다양한 기원의 공유 연결된 생물학적 활성 분자를 갖는 세포막-투과성 나노입자를 포함하는 조성물을 기반으로 하는 보편적 플랫폼(universal platform)을 제공한다. 이를 위해, 본 개시는 나노입자에 대한 단백질, 펩티드 및 상이한 RNA의 공유 결합을 보장하는 신규한 관능화 접근법을 본 명세서에 제시한다. 본 발명의 변형된 세포 투과성 나노입자는 세포 기능의 조절 및/또는 정상화를 위한 생물학적 활성 분자의 동시 세포내 전달을 위한 보편적 메커니즘을 제공하고, 이는 후속적으로 연구 및 개발, 약물 스크리닝 및 치료 용도에 사용되어, 세포 또는 장기 기능 및/또는 인간의 감염에 대한 신체 저항성을 개선할 수 있다.

[0015] 기술한 바에 따라, 일 양태에서, 본 개시는 RNA 페이로드를 세포의 내부로 전달하도록 구성된 조성물을 제공한다. 이 조성물은:

[0016] 링커에 의해 고체 나노입자 코어에 부착된 적어도 하나의 RNA 분자,

[0017] 고체 나노입자 코어에 부착된 적어도 하나의 양으로 하전된 세포 투과성 펩티드(CPP)(여기서, 관능화된 나노입자는 실질적으로 중성으로 하전되거나, 음 또는 양으로 하전된다)로 관능화된 다관능화된 나노입자 코어를 포함한다.

[0018] 나노입자 코어는 바람직하게는, 예를 들면, 이전에 과학 문헌에 기재된 것과 유사한 초상자성 산화철 또는 금

나노입자 또는 중합체성 생분해성 나노입자를 포함하는 생체적합성이다[참조: Lewin M et al., Nat. Biotech. 2000, 18, 410-414; Shen T, et al., Magn. Reson. Med. 1993, 29, 599?604; Weissleder, R. et al. American Journal of Roentgeneology 1989, 152, 167-173]. 이러한 나노입자는, 예를 들면, 골수 세포, 림프절, 비장 및 간의 자기 공명 영상법(잠재적 용도 중 하나는 표적 세포를 세포 내에서 표지하고, 세포의 세포외 표지 및 영상화에 의해 수행된 바와 같이 생체내에서 이들의 경로를 영상화하는 것이기 때문)을 위한 임상 설정에서 사용될 수 있다[참조: 예를 들면, Shen et al., Magn. Reson. Med. 29, 599(1993); Harisinghani et. al., Am. J. Roentgenol. 172, 1347(1999)]. 예를 들면, 크기가 50nm 미만이고 교차 결합된 세포막 투과성 Tat-유래 펩티드를 포함하는 자성 산화철 나노입자는 세포당 최대 30pg의 초상자성 철 나노입자의 양으로 조혈 세포 및 신경 전구세포 내로 효율적으로 내재화된다[참조: Lewin et al., Nat. Biotechnol. 18, 410 (2000)]. 추가로, 나노입자 도입은 골수 유래 CD34+ 원시 전구세포의 증식 및 분화 특성 또는 세포 생존율에 영향을 미치지 않는다[참조: Maite Lewin et al., Nat. Biotechnol. 18, 410(2000)]. 이러한 나노입자는 종양 발생 중에 유전자 발현이 소실되거나 백신접종에 필요한지의 여부에 관계없이 실질적으로 모든 목적 유전자의 생체내 발현에 사용될 수 있다.

[0019] 일부 실시양태에서, 나노입자 코어는 고체이다. 예를 들면, 고체 나노입자 코어는 키토산 또는 하이드록시아파타이트 기반 나노입자를 포함하지만 이들로 한정되지 않는 금속성 또는 비금속성일 수 있다. 본 개시에 포함되는 예시적 금속 나노입자는 자성 나노입자, 및 초상자성 철-기반, 은, 티타늄 나노입자를 포함한다. 예를 들면, 나노입자 코어는 철(예를 들면, 산화철)이거나, 또는 이를 포함할 수 있다. 또 다른 예시적 나노입자 코어는 금이거나, 또는 이를 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 나노입자 코어는 생체적합성 중합체를 포함한다. 예를 들면, 텍스트란 다당류 등의 중합체 코팅은 X/Y 관능기를 가질 수 있고, 이것에 다양한 길이의 관능기 또는 링커를 부착시킬 수 있다. 이어서, 링커는 RNA 분자, 및/또는 임의로 CPP 및/또는 양으로 하전된 모이어티(moiety) 등의 관능기에 공유적으로 부착된다. 링커는 또한 이들의 X/Y 관능기를 통해, 예를 들면, 추가 단백질, 마이크로RNA 및/또는 펩티드(또는 기타 소분자)에 부착되도록 구성될 수 있다. 가교결합을 위한 예시적 관능기는 보다 상세하게 기재되어 있고 본 개시의 이러한 양태에 포함된다.

[0021] 일부 실시양태에서, 나노입자 코어는 금속 또는 고체 코어 구조를 갖지 않는 중합체의 응집체이다. 대신에, 중합체의 응집은 내부에 갇힌 생물활성 분자를 포함하고, 이는 시간 경과에 따라 탈락하여 장기적 효과를 유도할 수 있다. 이러한 중합체성 나노입자는 공지되어 있고, 본 명세서에 기재된 바와 같이 다관능화되도록 당업자에 의해 구성될 수 있다.

[0022] 일부 실시양태에서, 나노입자 코어는 직경 약 5nm 내지 약 50nm, 직경 약 25 내지 약 45nm, 직경 약 30nm 내지 약 45nm, 직경 약 35nm 내지 약 45nm, 직경 약 40nm 내지 약 45nm, 직경 약 40nm 내지 약 50nm, 직경 약 20nm 내지 약 30nm, 또는 그 중의 기타 하위 범위 등의 직경 50nm 이하의 크기를 갖는 고체 나노입자 코어이다. 예시적 실시양태에서, 나노입자 코어는 약 5nm, 약 10nm, 약 20nm, 약 23nm, 약 25nm, 약 28nm, 약 30nm, 약 33nm, 약 35nm, 약 38nm, 약 40nm, 약 45nm 및 약 50nm의 직경을 갖는다.

[0023] 상기에서 나타난 바와 같이, 나노입자 기반 조성물은, 예를 들면, 세포내 이벤트를 표적화하고, 목적의 다양한 세포 유형의 세포 기능 및 특성을 조절하기 위해 적용될 수 있는 생물학적 활성 분자의 세포내 전달을 위한 우수한 비히클로서 작용한다. 따라서, 이 양태의 조성물은 하나 이상의 기능적 페이로드를 운반하도록 다관능화된 나노입자-기반 조성물을 제공한다. 나타난 바와 같이, 나노입자 코어는 적어도 RNA 분자 페이로드로 관능화된다. RNA 분자는 짧은 간섭 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA) 또는 메신저 RNA(mRNA) 등의 코딩 RNA일 수 있다.

[0024] 일부 실시양태에서, RNA 분자는 캡핑되지 않은 mRNA 분자이다. 메신저 RNA(mRNA)는 일반적으로 목적의 펩티드 또는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단일 가닥 RNA 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, mRNA는 "성숙" mRNA이고, 이는 코딩 엑손 사이에 산재하는 인트론 서열을 결여하고 있는 것을 의미한다. mRNA는 또한 진핵 세포에서 통상 발생하는 추가 변형을 가질 수 있다. 예를 들면, mRNA는 5' 캡 구조를 가질 수 있고, 이는 추가된 RNA 7-메틸гу아노신 캡을 포함한다. 이것은 변형된 구아닌 뉴클레오티드이고, 통상은 5'-5'-트리포스페이트 결합을 통해 연결되어 있다. 5' 캡 구조는 RNases에 의한 분해로부터 보호함으로써 분자의 안정성을 표준적으로 유지할 수 있다. 추가로, mRNA는 3' 말단에 폴리아데닐릴 테일을 포함할 수 있다. "폴리(A)" 테일은 또한 엑소뉴클레아제에 의한 분해로부터 보호함으로써 mRNA의 안정성을 촉진한다.

[0025] 일부 실시양태에서, mRNA는 캡핑되지 않은 mRNA 분자이다. 본 명세서에 사용된 "캡핑되지 않은"은 5'-5'-트리포

스페이트 결합을 통해 연결된 표준적 5' 캡 구조의 결여를 지칭한다. 이러한 실시양태에서, mRNA의 캡핑되지 않은 5' 말단은 링커에 결합하고, 링커는 또한 나노입자 코어 구조에 결합한다. 이의 5' 말단에서 나노입자에 테더링되는 경우, mRNA 분자는 안정적으로 유지되는 것으로 밝혀졌다. 임의의 특정 이론에 구속되지 않고, 본 명세서에 기재된 기타 관능기를 갖는 나노입자의 존재는 세포 내에 존재하는 뉴클레아제에 의한 분해로부터 mRNA의 이 부분을 보호하는 것으로 믿어진다.

- [0026] 다른 실시양태에서, RNA 분자는 캡핑된 mRNA 분자이고, 캡핑된 mRNA 분자의 3' 말단은 제1 링커에 공유적으로 결합된다. 이어서, 제1 링커는 나노입자 코어의 표면에 결합된다.
- [0027] 캡핑된 구성 또는 캡핑되지 않은 구성에 관계없이, mRNA 분자는 당해 기술분야에 공지된 단백질 및 코딩 서열에 관한 방대한 지식에 따라 목적 펩티드 또는 폴리펩티드(예를 들면, 기능성 단백질을 코딩하도록 구성될 수 있다. 예를 들면, mRNA 분자는 기타 바람직한 펩티드 및 폴리펩티드 중에서 목적 항원, 목적 효소(예를 들면, 텔로머라제), 또는 검출가능한 마커를 코딩할 수 있다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 조성물은 고체 나노입자 코어에 부착된 적어도 2개의 RNA 분자를 포함한다. 각각의 RNA 분자는 동일하거나 상이할 수 있는 링커에 의해 독립적으로 부착될 수 있다. RNA 분자는 동일하거나 상이할 수 있고, RNA 분자 중 적어도 하나는 캡핑되지 않은 mRNA 분자이고, 캡핑되지 않은 mRNA 분자의 5' 말단은 제1 링커에 공유적으로 결합되고, 이어서 나노입자 코어에 공유적으로 부착된다.
- [0029] 나타낸 바와 같이, RNA 분자는 제1 링커에 의해 나노입자 코어에 부착된다. 링커는 선형 링커 또는 분지 링커일 수 있다. 분지 링커는 단일 접촉점을 통해 나노입자 코어에 공유 결합되고, 하나 이상의 분지점에서 기원하는 복수의 분지를 갖는다. 전형적으로, 복수의 분지 중 적어도 2개는 개별 RNA 분자에 부착된다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 링커는 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상의

옹스트롬(\AA) 길이 등의 각각 적어도 6 옹스트롬 길이의 하나 이상의 링커로 구성된다. 임의의 특정 이론에 구속되지 않고, 이 길이의 링커에 의해 제공되는 거리는 충분한 유연성 및 나노입자 코어로부터의 거리를 가능하게 하여 mRNA 페이로드에 대한 리보솜의 접근을 가능하게 하고, 따라서 mRNA의 펩티드 또는 폴리펩티드 산물로의 번역을 가능하게 한다.

- [0031] 일부 실시양태에서, 제1 링커는 세포 내에서 절단되도록 구성된 링커 등의 절단가능한 링커이고, 그 결과, 나노입자 코어로부터 페이로드 분자가 방출된다. 이러한 방출은 mRNA 주형에서 리보솜 복합체 형성을 가능하게 하여 번역을 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커는 디설파이드 결합을 포함한다.
- [0032] 관능기를 나노포어(nanopore)에 부착하기 위한 적절한 링커 그룹 및 관련 방법이 공지되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제9675708호(참조에 의해 그 전체가 본 명세서에 편입됨). RNA 분자(및 잠재적으로 기타 관능기)를 나노입자에 가교결합하기 위해 사용될 수 있는 관능성 링커 그룹의 예시적이고 비제한적 예는 하기를 포함한다:
- [0033] $-\text{NH}_2$ (예: 라이신, $\alpha\text{-NH}_2$);
- [0034] $-\text{SH}$;
- [0035] $-\text{COOH}$;
- [0036] $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})(\text{NH}_2)$;
- [0037] 탄수화물;
- [0038] $-\text{하이드록실}(\text{OH})$; 및
- [0039] 링커 상의 아지도 그룹의 광화학을 통한 부착.
- [0040] 가교결합 시약(crosslinking reagent)의 예시적이고 비제한적 예는 하기를 포함한다:
- [0041] 아미노 그룹 및 티올 그룹을 가교결합하기 위한 설포숙신이미딜 유도체인 설포-SMCC를 포함하는, SMCC[숙신이미딜 4-(N-말레이미도-메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트];
- [0042] 설포-LC-SMCC를 포함하는, LC-SMCC(장쇄 SMCC);
- [0043] 아민과 반응하고 티올 그룹을 제공하는 설포-SPDP를 포함하는, SPDP[N-숙신이미딜-3-(피프리디디티오)-프로프리

오네이트];

- [0044] 실포-LC-SPDP를 포함하는, LC-SPDP(장쇄 SPDP);
- [0045] -COOH 그룹과 -NH₂ 그룹을 연결하기 위해 사용되는 시약인 EDC[1-에틸 하이드로클로라이드-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드];
- [0046] 실포-SM(PEG)_n 유도체를 포함하는, SM(PEG)_n(여기서, n=1,2,3,4... 24 글리콜 단위이다);
- [0047] 실포-SPDP(PEG)_n 유도체를 포함하는, SPDP(PEG)_n(여기서, n=1,2,3,4...12 글리콜 단위이다);
- [0048] 카복실 그룹과 아민 그룹을 모두 포함하는 PEG 분자; 및
- [0049] 카복실 그룹과 설프하이드릴 그룹을 모두 포함하는 PEG 분자.
- [0050] 캡핑 및 차단 시약의 예시적이고 비제한적 예는 하기를 포함한다:
- [0051] NH에 특이적인 시트라콘산 무수물;
- [0052] SH에 특이적인 에틸 말레이미드; 및
- [0053] 말레이미드에 특이적인 메르캅토에탄올.
- [0054] 적어도 하나의 세포-투과성 펩티드(CPP) 및/또는 적어도 하나의 양으로 하전된 모이어티는 또한 링커 작제물을 통해 나노입자 코어에 부착시킬 수 있다. 임의의 적절한 링커 작제물을 사용하여, 적어도 하나의 세포-투과성 펩티드(CPP) 및/또는 적어도 하나의 양으로 하전된 모이어티를 상기 기재된 것 등의 나노포어 코어에 부착시킬 수 있다. 일 실시양태에서, 적어도 하나의 CPP는 제2 링커에 의해 고체 나노입자 코어에 부착된다. 제1 링커 및 제2 링커는 동일하거나 상이한 유형의 링커일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 링커 및 제2 링커는 상이하고, 제2 링커는 제1 링커보다 더 길다. 일 실시양태에서, 적어도 하나의 양으로 하전된 모이어티는 제3 링커에 의해 고체 나노입자 코어에 부착된다. 제1 링커 및 제3 링커는 동일하거나 상이한 유형의 링커일 수 있다. 일 실시양태에서, 제1 링커 및 제3 링커는 상이하고, 제3 링커는 제1 링커보다 더 길다. 임의의 특정 이론에 구속되지 않고서, 제1 링커와 비교하여 제2 및/또는 제3 링커의 보다 긴 길이는 보다 작은 모이어티(즉, CPP 및/또는 양으로 하전된 모이어티)를, 더 벌키한 RNA 분자의 존재에도 불구하고, 나노포어 코어의 표면으로부터 추가로 연장 되도록 한다. 이와 같이 배열되면, CPP 및/또는 양으로 하전된 모이어티는 주변 환경과 상호작용할 수 있는 보다 많은 기회를 가질 수 있다.
- [0055] 적어도 하나의 양으로 하전된 모이어티는 벌키한 RNA 분자에 의해 제공되는 음전하를 상쇄하기 위해 추가의 양전하를 제공한다. 동일한 나노입자 코어에 연결된 동일한 양으로 하전된 모이어티의 복수의 단위가 존재할 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 동일한 나노입자 코어에 부착된 복수의 상이한 종류의 하전된 모이어티의 하나 이상의 단위가 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 양으로 하전된 모이어티는 하전된 펩티드이다. 예시적 하전 펩티드는 2개 이상의 양으로 하전된 아미노산, 예를 들면, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 하전 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0056] 일부 실시양태에서, 고체 나노입자 코어는 복수의 mRNA 및/또는 siRNA 분자 및 약 100:1 내지 약 1:10의 비율, 예를 들면, 약 100:1, 약 90:1, 약 80:1, 약 70:1, 약 60:1, 약 50:1; 약 40:1, 약 30:1, 약 20:1, 약 10:1, 약 5:1, 약 1:1, 약 1:5, 및 약 1:10, 및 이들 사이의 임의의 범위의 비율로 이들에 연결된 복수의 양으로 하전된 모이어티를 갖는다.
- [0057] 상기에 나타낸 바와 같이, 다관능화된 나노입자 코어는 실질적으로 중성으로 하전되거나, 또는 양으로 하전된다. 이와 관련하여, 부착된 mRNA 분자(들)에 의해 부여되는 실질적 음전하는 양전하에 의해 상쇄된다. 용어 "실질적으로 중성"은, 약간의 음전하 또는 양전하가 허용되는, 거의 중성 전하를 지칭한다.
- [0058] 세포 투과성 펩티드(CPP)는 관련 작제물의 세포 흡수를 촉진하는 짧은 펩티드이다. 일반적 실시양태에서, 적어도 하나의 CPP는 비교적 대량으로 하전된 아미노산(예를 들면, 라이신 또는 아르기닌)을 함유하거나, 또는 극성의 하전된 아미노산 및 비극성의 소수성 아미노산의 교호 패턴을 갖는다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 CPP는 5 내지 9개의 염기성 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 CPP는 5 내지 9개의 연속 염기성 아미노산을 포함한다. 예시적 CPP에는 본 개시에 포함되는 HIV-1로부터 수득된 전사활성화 전사 활성화체(TAT) 또는 이의 유도체가 포함된다. 기타 대표적 CPP에 대한 논의는 문헌[참조: 예를 들면, Okuyama M., et al., (February 2007). "Small-molecule mimics of an alpha-helix for efficient transport of proteins

into cells". *Nature Methods*. 4(2): 153-9, 참조에 의해 그 전체가 본 명세서에 편입됨]을 참조한다.

- [0059] 일부 실시양태에서, 조성물은 고체 나노입자 코어에 부착된 적어도 하나의 siRNA 분자를 추가로 포함하고, 여기서 적어도 하나의 siRNA 분자는 목적 유전자에 특이적이다. 이러한 문맥에서 사용된 바와 같이, 용어 "~에 특이적"은 목적 유전자의 전사물에 특이적으로 하이브리드화하고, 따라서 기능적 단백질로의 번역을 방해할 수 있는 siRNA 분자 자체의 서열 특이성을 지칭한다. 이와 같이, siRNA는 목적 표적 유전자의 기능적 발현의 녹다운을 유도할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 고체 나노포어 코어에 부착된 2개 이상의 상이한 siRNA 분자를 추가로 포함한다. 2개 이상의 siRNA 분자 각각은 상이한 목적 유전자에 특이적이거나, 또는 목적 유전자의 상이한 서열에 특이적이다. siRNA 분자 및 RNA 분자(예를 들면, mRNA 분자)는 약 1:20, 약 1:15, 약 1:10, 약 1:5, 약 1:1, 약 5:1, 약 10:1, 약 15:1, 및 약 20:1 등의 약 1:20 내지 약 20:1의 비율로 존재할 수 있다. 다양한 병적 상태에서, 하나 이상의 신호전달 분자가 비정상적으로 과발현되는 반면, 다른 유전자의 발현은 사일런싱된다. 따라서, 이들 분자를 다관능화된 나노입자로 동시에 표적화하여, siRNA에 의한 과발현된 유전자의 발현을 녹다운시키거나, mRNA 또는 miRNA 또는 펩티드 또는 단백질 등의 기타 생물활성 분자에 의한 사일런싱 유전자의 발현을 유도하는 것은 정상 표현형을 회복하기 위한 강력한 수단을 제시한다.
- [0060] 본 개시는 또한 다관능화된 나노입자 코어가 단백질, 펩티드 및 기타 소분자 등의 기타 기능성 분자를 또한 포함하는 실시양태를 포함한다. 추가 기능성 분자는 세포 내에서 유전자 전사 또는 신호전달 경로를 추가로 변형 또는 조절하기 위해 합리적으로 선택할 수 있다. 예를 들면, 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 편입되는 미국 특허 제9675708호를 참조한다.
- [0061] 조성물은 배양물 또는 대상체(subject)의 생체내에서 살아있는 세포로의 투여를 용이하게 하는 추가 성분을 추가로 포함할 수 있다. 예시적 성분에는, 당해 기술분야에 공지된 바와 같이 투여량 및 투여 방식에 대해 적절하게 제형화된, 허용가능한 담체, 부형제, 임의의 완충제 등이 포함된다.
- [0062] 또 다른 양태에서, 본 개시는 상기 기재된 관능화된 나노입자를 포함하는 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 조성물의 투여를 받고, 그 후, RNA 분자는 몇몇 방식으로 세포를 변형 또는 조절하는 기능성 단백질로 발현된다. 일부 실시양태에서, siRNA 자체물 등의 추가 임의 성분은 세포에서 신호전달 경로 또는 기타 유전자 발현 패턴을 추가로 조절한다. 생성된 세포는 또한 대상체에게 투여시에 치료적 가치를 가질 수 있다. 따라서, 세포는 생체외에서 상기 기재된 조성물의 투여로 변형될 수 있다.
- [0063] 또 다른 양태에서, 본 개시는 세포에서 목적 폴리펩티드를 발현시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 기재된 바와 같이 조성물을 세포에 전달하고, RNA 분자의 발현을 가능하게 하는 것을 포함하고, 여기서 RNA 분자는 목적 폴리펩티드를 코딩한다. 예시적 비제한적 폴리펩티드에는 항원, 효소(예를 들면, 텔로머라제) 및 검출가능한 마커를 포함한다. 설명하기 위해, 일 실시양태에서, 상기 기재된 조성물은 텔로머라제를 코딩하는 mRNA에 대한 전달 플랫폼으로서 사용된다. 시험관내 또는 생체내에서 세포에 대한 조성물의 투여는 텔로머라제-코딩 mRNA의 세포로의 효율적 전달 및 번역을 초래할 수 있다. 발현된 텔로머라제는 세포 염색체의 텔로미어를 신장하고, 따라서 세포의 보다 강력한 수명을 촉진할 수 있다. 전반적으로, 이것은 대상체에서 노화-방지 치료의 불가결한 요소일 수 있다. 또 다른 예시적 실시양태에서, 조성물은 종양 억제 유전자(들)(TSG)를 코딩하는 mRNA(들)를 포함하고, 이의 통상의 기능은 세포 형질전환 및 악성 클론 성장을 억제하는 것이고, 이의 불활성화는 종양 세포 성장에 유리하고, 다양한 암에서 빈번히 사일런싱된다. 예시적 TSG는 고형 종양 조직 또는 혈액암 백혈병에서 사일런싱하는 것으로 보고된 PTEN, TP53, p16 및 기타 유전자이다[참조: Oliveira AM, Ross JS, Fletcher JA. Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *Am J Clin Pathol*. 2005 Dec;124 Suppl:S16-28. doi: 10.1309/5XW3L8LU445QWGQR; Wang L, Wu C, Rajasekaran N, Shin Y: Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol Biochem* 2018; 51:2647-26930].
- [0064] 하기는 다관능화된 나노입자를 조립하기 위한 예시적 접근법을 설명한다.
- [0065] 개시된 플랫폼에 유용한 나노입자는 산화철, 하이드로아파타이트 또는 금의 예로서 포함하는 코어를 포함할 수 있거나, 또는 코어를 포함하지 않지만, 시간 경과에 따라 탈락하고 장기간 지속되는 효과를 유도하는 생물활성 분자 내부에 포획된 캡슐화된 중합체 나노입자일 수 있다.
- [0066] 생체적합성 나노입자는 표면 상의 관능기(예: 아민 또는 카복시 그룹)로 처리되고, 참조에 의해 그 전체가 본 명세서에 편입되는 미국 특허 제9675708호에 기재된 바와 같은 다양한 수단에 의해 단백질, 핵산 및 짧은 펩티드에 화학적으로 결합한다. 간략하게, 초상자성 또는 대안적 나노입자는 크기가 50nm 미만이고, 나노입자당 10

개 이상의 아민 그룹을 갖는 1ml당 10^{12} - 10^{20} 나노입자일 수 있다.

- [0067] SMCC(Thermo Fisher)는 ACROS(밀봉된 바이알 및 무수)로부터 수득된 디메틸포름아미드(DMF)에 1mg/ml 농도로 용해될 수 있다. 샘플은 밀봉되고, 거의 즉시 사용된다.
- [0068] 10마이크로리터의 용액을 200마이크로리터 용적의 나노입자에 첨가한다. 이것은 존재하는 이용가능한 아민 그룹에 과량의 SMCC를 제공하고, 반응을 1시간 동안 진행시킨다. 과량의 SM 및 DMF는 3,000 달톤의 컷오프를 갖는 아미콘(Amicon) 원심 필터 컬럼을 사용하여 제거할 수 있다. 적절한 완충액 교환을 보장하기 위해서는 통상 5회의 용적 교환이 필요하다. 이 단계에서 과량의 SMCC를 제거하는 것이 중요하다.
- [0069] 상기 기재된 바와 같은 임의의 RNA, 및 임의로 siRNA, 펩티드-기반 분자 및 목적 단백질이 활성화된 나노입자에 첨가된다. 생물활성 분자-나노입자 용액을 반응시키고, 미반응 분자는 적절한 MW 컷오프(GFP 단백질의 경우는 50,000 달톤 컷오프)를 갖는 원심분리 필터 장치에 의해 제거된다. 샘플은 -80°C 의 냉동고 또는 4°C 에 보관된다. 아미콘(Amicon) 스핀 필터 컬럼을 사용하는 대신에, 바이오 라드(Bio Rad) P 크기 배제 컬럼 등의 고체 크기 필터링 성분을 포함하는 소형 스핀 컬럼을 사용할 수도 있다. 또한, SMCC는 설프 유도체(Sulfo-SMCC)로도 구입할 수 있기 때문에, 수용성이 더 높다는 점에 유의해야 한다. DMSO는 또한 표지 시약의 용매 담체로서 DMF 대신에 치환될 수 있다. 다시 말해서, 이는 무수(anhydrous)이어야 한다.
- [0070] RNA 분자는 음으로 하전되어 있기 때문에, 세포막을 용이하게 투과하지 못하는 것으로 공지되어 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 조합 접근법은 양으로 하전된 펩티드와 음으로 하전된 RNA 분자의 밸런스를 제공한다. 추가로, siRNA/miRNA 분자는 통상 짧고, 통상은 길이가 50개 미만의 뉴클레오티드 길이이기 때문에, 이들의 누적 음전하는 비교적 작은 반면, 유전자 특이적 mRNA는 실질적으로 더 큰 누적 음전하와 함께 훨씬 더 길다(통상은 500개 이상의 뉴클레오티드 길이, 더 빈번하게는 1500개 이상의 뉴클레오티드). 따라서, 이러한 RNA 분자를 세포 내로 전달하기 위해, 2개 이상의 양으로 하전된 아미노산으로 구성된 펩티드 등의 양으로 하전된 분자의 특정 비율은 이러한 펩티드 및 1개 이상의 mRNA 분자로 다관능화된 나노입자의 투과를 보장해야 한다.
- [0071] 핵산은 5' 또는 3' 말단에서 나노입자에 부착될 수 있다. 캠핑되지 않은 mRNA 분자는 상기에서 설명한 바와 같이 5' 말단에 의해 링커에 부착될 수 있다. 또는, T4 RNA 리가제를 사용하여, 황 그룹을 갖는 뉴클레오티드를 RNA 분자의 3' 말단에 추가할 수 있고, 이를 사용하여 나노입자에 부착시킬 수 있다.
- [0072] 3' 말단 표지화(end labeling)를 위한 예시적 프로토콜은 하기를 단일 RNase 비함유 미세분리 튜브에서 조합하는 것을 포함한다:
- [0073] $2\mu\text{l}$ $10\times$ T4 RNA 리가제 완충액
- [0074] 50 내지 100pmol RNA
- [0075] 등몰량(50 내지 100pmol) [^{32}P]pCp
- [0076] $18\mu\text{l}$ 의 최종 용적까지 RNase 비함유 물
- [0077] $2\mu\text{l}$ T4 RNA 리가제(10 U)를 첨가하고;
- [0078] 4°C 에서 밤새(10-12시간) 인큐베이션(incubating)하고; 제조원의 권장 사항에 따라 혼합물을 RNase 비함유 세파덱스(Sephadex) G-25 또는 G-50 스핀 컬럼(예: NucAway 스핀 컬럼)에 적용하여 비도입된 표지(incorporated label)를 제거한다.
- [0079] 기타 모든 가교결합 시약은 유사한 방식으로 적용될 수 있다. SPDP는 SMCC와 동일한 방식으로 단백질/적용가능한 펩티드에도 적용된다. 이는 DMF에 용이하게 용해된다. 디티올은 1시간 이상 DTT와의 반응에 의해 절단된다. 부산물 및 미반응 물질을 제거한 후, 3,000MW 컷오프의 아미콘(Amicon) 원심 필터 컬럼을 사용하여 정제한다.
- [0080] 나노입자를 펩티드, 상이한 RNA 분자 또는 단백질로 표지하기 위한 또 다른 접근법은 참조에 의해 그 전체가 본 명세서에 편입되는 미국 특허 제9675708호에 기재된 바와 같이 2개의 상이한 이관능성 커플링 시약을 사용하는 것일 수 있다.
- [0081] 일 실시양태에서, 다양한 비율의 SMCC 표지된 단백질 및 펩티드를 비드에 첨가하고, 반응시킨다. 링커는 부착된 분자에 형태학적 유연성을 제공하여, 상호작용하는 파트너를 회전시켜 결합시킬 수 있다. 추가로, 링커는, 세포 내에서 1회 NP를 생물활성 분자로부터 분리하기 위해, 절단가능하고, 보다 구체적으로 세포내 프로테아제에 의

해 절단되거나, 또는 세포내 분자에 의해 환원될 수 있다.

[0082] 또 다른 양태에서, 본 발명은 또한, 종양형성을 유발 또는 매개하거나 악성 종양 세포의 확장을 유도하는 것으로 공지된 종양유전자 또는 기타 유전자의 발현을 녹 다운하는 것을 목적으로 하고/하거나, 종양형성 중에 소실되거나, 또는 강력한 면역 반응 및 다양한 감염에 대한 보호에 필요한 유전자 산물의 발현을 유도하는 것을 목적으로 하여, 세포내 활성의 조절을 위해 관능화된 나노입자에 부착된 몇몇 생물활성 분자(예를 들면, 단독으로 또는 유전자-특이적 mRNA와 조합하여 목적의 상이한 유전자에 특이적인 하나 이상의 siRNA)를 동시에 전달하는 방법에 관한 것이다. 예를 들면, 상업적으로 이용 가능하거나, 표준 또는 변형된 실험 절차를 사용하여 수득된 인간 세포, 섬유아세포 또는 기타 세포 유형은 먼저, 세포가 부착되는 기질(공급 세포, 젤라틴, 마르티젤, 피브로넥틴 등)의 존재 또는 부재하에 고체 표면 상에 멸균 조건하에 플레이팅(plating)된다. 플레이팅된 세포는 세포 분열/증식 또는 허용가능한 세포 생존율의 유지를 가능하게 하는 특정 인자의 조합으로 소정 시간 동안 배양된다. 이의 예로서는, 혈청 및/또는 세포 유형에 적합한 다양한 성장 인자가 있고, 이는 이후에 회수 또는 갱신될 수 있고, 배양을 계속할 수 있다. 플레이팅된 세포는, 자장의 존재하 또는 부재하에 본 명세서 및 다른 곳에서 간략하게 설명된 다양한 방법을 사용하여, 공유 연결된 심장 특이적 재프로그래밍 인자가 부착된 관능화된 생체적합성 세포 투과성 나노입자의 존재하에 배양된다(예를 들면, 이의 전체가 참조에 의해 본 명세서에 편입되는 US 제2014/0342004호 참조). 초상자성 나노입자의 경우에 자석의 사용은 세포와 나노입자 사이의 접촉 표면적을 대폭 증가시키고, 이에 의해 세포막을 통한 관능화된 나노입자의 투과를 추가로 개선시킨다. 필요한 경우, 세포 모집단은 관능화된 나노입자로 반복적으로 처리하여 생물활성 분자를 세포내로 전달한다.

[0083] 세포는 배양 배지에 부착 또는 현탁된 상태로 유지되고, 혼입되지 않은 나노입자는 원심분리 또는 세포 분리에 의해 제거되어, 클러스터로서 존재하는 세포가 잔류한다. 이어서, 세포를 재현탁하고, 적절한 기간 동안 신선한 배지에서 재배양한다. 세포는, 표적화된 특정 생물활성 분자 및/또는 신호전달 경로의 변경이 관찰될 때까지 분리, 재현탁 및 재배양의 복수 사이클을 통해 수행할 수 있다. 본 발명은 인간 섬유아세포, 혈액 세포, 상피 세포, 중간엽 세포 등의 광범위한 세포 유형에 적용될 수 있다.

[0084] 추가로, 이러한 다관능화된 나노입자는 또한 직접 또는 카테터 매개 전달을 통해 또는 백신접종 목적을 위해 종양(암 치료를 위해) 또는 기타 조직(예: 근육내)으로 직접 도입될 수 있다.

[0085] 세포 활성의 조절은, 직접적이든 간접적이든, 다양한 단백질, 펩티드, 소분자, 마이크로RNA, siRNA, mRNA 등을 포함할 수 있는 생물활성 분자에 의해 다양한 세포 유형 또는 조직을 처리하는 것을 기반으로 한다. 이들 생물활성 분자는 세포막을 투과하지 못할 수 있고, 특별한 전달 수단 없이는 세포 핵에 도달하지 못할 수 있다. 추가로, 이러한 생물활성 분자는 단독으로 반감기가 짧고, 다양한 프로테아제 및 뉴클레아제에 노출되면 분해된다. 이러한 단점은 생물활성 분자의 효능을 감소시키고, 현저한 효과를 달성하기 위해, 훨씬 더 많거나 반복 투여의 치료를 필요로 한다. 따라서, 본 발명에서는 관능화된 나노입자를 사용하여 상술한 단점을 극복한다. 보다 구체적으로, 이러한 생물활성 분자는, 다양한 비율로 나노입자에 연결되고 원래 "네이키드" 상태와 비교하는 경우, 세포 투과성 및 세포내 활성 표적화 능력을 부여하는 신규한 물리적, 화학적, 생물학적 기능 특성을 획득하고, 그 결과, 조기 분해에 대한 개선된 내성을 초래하고, 목적의 몇몇 표적 유전자 및/또는 세포내 신호 전달 경로의 발현을 동시에 조절 및 제어하는 후천적 능력을 초래한다.

[0086] 일 양태에서, 본 개시는 세포 내에서 텔로미어를 증가시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 세포가 분열할 때마다, 염색체 텔로미어는 짧아진다. 수회의 분열, 예를 들면, 약 40회의 분열 후, 텔로미어는 너무 짧아질 수 있어, 세포의 생존율과 건강에 영향을 미치고, 노화된 표현형과 최종적으로 세포 사멸을 초래한다. 조직 또는 생물 수준에서, 이것은 노화와 생물학적 활성의 저하로 나타난다. 바이러스 기반 연구에 따르면, 텔로머라제를 코딩하는 외인성 핵산의 세포로의 전달이 텔로머라제 효소의 발현을 초래할 수 있다[참조: Ojeda, Diego, et al. "Increased in vitro glial fibrillary acidic protein expression, telomerase activity, and telomere length after productive human immunodeficiency virus-1 infection in murine astrocytes." *Journal of Neuroscience Research* 92.2 (2014): 267-274; and Hong, Jin Woo, and Chae-Ok Yun. "Telomere Gene Therapy: Polarizing Therapeutic Goals for Treatment of Various Diseases." *Cells* 8.5 (2019): 392, 이들 각각은 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 편입됨]. 발현된 텔로머라제는 표적 세포의 텔로미어를 연장시켜 보다 젊은 세포 표현형을 생성하고, 세포 및 관련 조직의 수명을 연장시킨다. 상기 나타난 바와 같이, 개시된 나노입자는, mRNA로 관능화된 경우, 이중 유전자의 바이러스-기반 발현에 대한 효율적 대체물을 제공하는 대안의 세포-형질전환 비히클을 제공한다. 더욱이, 현재 개시된 나노입자-기반 접근법은 장기간 안정성의 추가 이점을 갖고, 외래 분자가 염색체에 도입되는 것을 회피하고, 따라서 바이러스-기반 유전자 요법의 잠재적으로 유해한 부작용을 회피할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 기재된 바와 같이 다관능화된 나노입자를 통해 실시되는 텔로머

라제-기반 치료는 표적 세포에서 텔로머라제의 발현을 성공적으로 유발하고, 중단적 및 유해한 염색체 삽입의 위험 없이, 젊은 표현형을 촉진하고, 세포에서 수명을 연장하는 데 적어도 동등한 결과를 달성할 것이다.

[0087] 이 양태는 생체내 표적 세포, 세포, 조직 등이 텔로머라제를 코딩하는 mRNA로 관능화된 치료 유효량의 개시된 나노입자와 접촉시키는 치료 또는 요법의 방법에 적용될 수 있다. 이 방법은 일반적으로 세포/조직/신체에서 텔로머라제를 확장하고, 이에 의해 보다 젊은 표현형을 촉진하고, 수명을 연장시키며, 노화의 영향을 감소 또는 역전시키기 위해 적용될 수 있다. 투여는 전신적 또는 국소적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 세포 또는 조직이 중추 신경계에 있는 경우, 투여는, 예를 들면, 경막내 주사를 통해 수행될 수 있다.

[0088] 본 명세서에 포함된 전달 플랫폼의 또 다른 용도는 세포 활성화에 대한 효과에 대한 생물활성 분자(화합물 또는 2 개 이상의 화합물의 조합)의 스크리닝/시험이다. 이는, 본 명세서에 개시된 방법을 사용하여 다관능화된 나노입자에 부착된 화합물을 목적 세포 모집단(예: 섬유아세포, 혈액 세포, 중간엽 세포)과 조합하거나, 또는 조직 주사시에, 적절한 기간 동안 배양/인큐베이팅하고, 이어서 다관능화된 나노입자와 함께 전달된 화합물(들)의 활성화로부터 발생하는 임의의 조절 효과를 결정하는 것을 포함한다.

[0089] 본 명세서에 포함된 전달 플랫폼의 또 다른 용도는 의약으로서, 또는 인간 또는 동물 신체의 치료를 목적으로 하는 전달 장치에서 특수화된 세포의 제형화이다. 이에 의해, 임상의는 혈관계에서 또는 직접 근육 또는 장기 벽으로 목적의 정상 또는 비정상 조직 내부 또는 주변에서 관능화된 나노입자를 투여할 수 있고, 이에 의해 사용된 생물활성 분자가 세포에 유입되고, 손상을 제어하고, 조직 근육의 재생/재성장 및 특수 기능의 회복에 참여하게 된다.

[0090] 추가 정의

[0091] 본 명세서에서 특별히 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에게 동일한 의미를 갖는다. 개업의는 특히 당해 기술분야의 정의 및 용어에 대해 문헌[참조: Sambrook J., et al. (eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Plainview, New York (2001); Ausubel F.M., et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York (2010); and Coligan J.E., et al. (eds.), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York(2010)]을 참조한다.

[0092] 특허청구범위에서 용어 "또는"의 사용은, 본 개시가, 대안 및 "및/또는"을 지칭하는 정의를 뒷받침하더라도, 대안만을 지칭하도록 명시적으로 나타내지 않는 한 또는 대안이 상호 배타적이지 않는 한, "및/또는"을 의미하기 위해 사용된다.

[0093] 장기간의 특허법에 따라, 청구범위 또는 명세서에서 단어 "포함하는"과 함께 사용되는 경우, 단어 "a" 및 "an"은, 특별히 명기하지 않는 한, 하나 이상을 나타낸다.

[0094] 문맥이 명백하게 달리 요구하지 않는 한, 상세한 설명 및 청구범위 전반에 걸쳐, 단어 "포함하다", "포함하는" 등은, 배타적 또는 망라적 의미와 반대되는, 포괄적 의미로 해석되어야 하고; 즉, "포함하지만 이들로 한정되지 않는"의 의미에서 나타낸다. 단수형 또는 복수형을 사용하는 단어에는 각각 복수형 및 단수형이 포함된다. 추가로, 단어 "여기에", "상기" 및 "하기" 및 유사한 의미를 갖는 단어는, 본 출원에서 사용되는 경우, 본 출원의 임의의 특정 부분이 아니라 본 출원 전체를 참조해야 한다. 단어 "약"은 기재된 관련 수치 상하의 사소한 변동의 범위 내의 수치를 나타낸다. 예를 들면, "약"은 표시된 관련 수치 상하의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 범위 내의 수치를 지칭할 수 있다.

[0095] 용어 "대상체", "개체(individual)" 및 "환자"는 본 명세서에서 호환적으로 사용되어, 치료를 위해 평가되고/되거나 치료되는 포유동물을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 포유동물은 인간이다. 용어 "대상체", "개체" 및 "환자"는 암을 갖는 개체를 포함하지만 이들로 한정되지 않는다. 대상체는 인간일 수 있지만, 이 용어는 또한 다른 포유동물, 특히 인간 질환에 대한 실험실 모델로서 유용한 포유동물, 예를 들면, 마우스, 랫트, 개, 비인간 영장류 등을 포함한다.

[0096] 용어 "치료하는" 및 이의 문법적 변형은 환자 또는 상태(예를 들면, 암, 감염성 질환, 또는 자가면역 질환)의 치료 또는 개선 또는 예방에서 성공의 임의의 징후를 지칭하고, 감소; 관해; 증상의 경감 또는 질환 상태를 환자가 더 잘 견딜 수 있게 하는 것; 퇴화 또는 쇠퇴 속도의 저하; 또는 퇴화의 최종 지점을 덜 쇠약하게 하는 것 등의 임의의 객관적 또는 주관적 파라미터를 포함한다.

[0097] 증상의 치료 또는 개선은 객관적 또는 주관적 파라미터를 기반으로 할 수 있고, 의사에 의한 검사 결과를 포함

한다. 따라서, 용어 "치료하는"은 질환 또는 상태(예를 들면, 암, 감염성 질환 또는 자가면역 질환)와 연관된 증상 또는 상태의 발증을 예방 또는 지연, 또는 완화, 또는 저지 또는 억제하기 위한 본 개시의 화합물 또는 약제의 투여를 포함한다. 용어 "치료 효과"는 대상체에서 질환 또는 상태, 질환 또는 상태의 증상, 또는 질환 또는 상태의 부작용의 경감, 제거 또는 예방을 지칭한다.

[0098] 개시된 것은, 개시된 방법 및 조성물에 사용될 수 있거나, 조합하여 사용될 수 있거나, 제조에 사용될 수 있거나, 또는 제품인 재료, 조성물 및 성분이다. 이들 재료의 조합, 서브세트, 상호작용, 그룹 등이 개시되는 경우, 이들 화합물의 각각의 및 모든 단일 조합 및 순열이 명시적으로 개시되지 않을 수 있음에도 불구하고, 다양한 개별 및 집합적 조합의 각각이 구체적으로 고려되는 것으로 이해된다. 이 개념은 설명된 방법의 단계를 포함하지만 이들로 한정되지 않는 본 개시의 모든 양태에 적용된다. 따라서, 임의의 전술한 실시양태의 특정 요소는 다른 실시양태의 요소와 조합되거나, 요소 대신에 사용될 수 있다. 예를 들면, 실행될 수 있는 다양한 추가 단계가 있는 경우, 이러한 추가 단계 각각은 개시된 방법의 임의의 특정 방법 단계 또는 방법 단계의 조합으로 수행될 수 있고, 이러한 각각의 조합 또는 조합의 서브세트 각각은 구체적으로 고려되고 개시된 것으로 간주되어야 하는 것으로 이해된다. 추가로, 본 명세서에 기재된 실시양태는 본 명세서의 다른 곳에서 기재되거나 당해 기술분야에 공지된 것 등의 임의의 적합한 재료를 사용하여 실시될 수 있음을 이해해야 한다.

[0099] 본 명세서에 인용된 간행물 및 이들이 인용되어 있는 주제는 참조에 의해 그 전체가 구체적으로 본 명세서에 편입된다.

[0100] 실시예

[0101] 하기 실시예는, 당업자에게 본 발명을 작성 및 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위해 기재되고, 본 발명자들이 이들의 발명으로 간주하는 범위를 제한하려는 것이 아니며, 하기 실험이 실행된 모든 또는 유일한 실험인 것을 나타내는 것을 의도하지 않는다.

[0102] 실시예 1

[0103] 이 실시예는, 본 개시에 포함되는 다관능화된 나노입자를 사용하여, 표적 유전자의 기능적 발현을 측정가능하게 감소시킬 수 있는 siRNA 페이로드를 성공적으로 전달하는 검정을 설명한다.

[0104] 표면에 유리 아민 그룹이 이용할 수 있는 세포 투과성 나노입자는 나노입자 상의 아민 그룹과 공유결합을 형성할 수 있는 이중특이성 링커로 처리되어, 링커-관능화된 나노입자를 생성한다. 예를 들면, 말레이미드를 함유하는 나노입자 링커의 유리 말단에 결합하도록 화학적으로 변형된 인간 PTEN siRNA를 추가하여 공유 결합을 형성하고, 이어서 결합되지 않은 PTEN siRNA 분자로부터 광범위한 세척 또는 기타 수단으로 분리한다. 생성된 나노입자는, PTEN 유전자를 발현하는 세포에 첨가되면, 도 1에 도시된 바와 같이, 이의 PTEN-특이적 siRNA 카고를 세포 세포질로 전달한다. 세포의 세포질에 들어가면, siRNA 분자는 PTEN mRNA와 상호작용하고, mRNA 분해로서 공지되어 있는 다단계 프로세스를 유발하고, 이는 PTEN 유전자 발현의 감소를 초래한다. 이 접근법을 사용하면, 다양한 정도의 PTEN 녹다운을 달성할 수 있다. 상기에서 설명한 바와 같이 생성된 PTEN-다관능화된 나노입자는, PTEN-특이적 프라이머 및 siRNA-처리된 세포 또는 siRNA의 부재하에 나노입자로 처리된 대조군 세포로부터 단리된 RNA를 사용한 정량적 실시간 RT-PCR에 의해 결정하는 경우, 정상 PTEN 발현 수준의 적어도 60%를 녹다운할 수 있다. 이들 데이터는 개시된 다관능화된 나노입자가 기능적 역할을 손상시키지 않고서 세포의 내부로 RNA-기반 페이로드를 효율적으로 전달할 수 있다는 개념 실증을 확립한다. 보다 구체적으로, 이 데이터는, 다관능화된 나노입자가 siRNA 작제물을 전달하여 목적 표적 유전자의 발현을 성공적으로 녹다운할 수 있음을 입증한다.

[0105] 실시예 2

[0106] 이 실시예는, 본 개시에 포함되는 다관능화된 나노입자를 사용하여, 세포 번역 기구에 의해 효율적으로 발현되어 측정가능한 유전자 발현을 초래하는 mRNA를 성공적으로 전달하는 검정을 설명한다.

[0107] 이 경우, 번역시 적색 형광 단백질을 발현하는 mCherry mRNA는 T7 프로모터의 제어하에 클로닝된 mCherry cDNA를 사용하여 생성된다. T7 시험관내 전사 키트(New England Biolabs, Ipswich, MA)를 사용하여 캡핑되지 않은 mCherry mRNA를 생성하고, 이는 후속적으로 퀴아겐(Qiagen) RNA 정제 컬럼(Qiagen, Germantown, MD)을 사용하여 정제하고, 제조원(New England BioLabs)의 지시에 따라 알칼리성 포스파타제 및 S-감마-ATP를 사용하여 화학적으로 변형시키고, 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 생성된 링커-관능화된 세포-투과성 나노입자와 반응시켰다. 수득된 mRNA 다관능화된 나노입자 또는 mCherry mRNA 부재하의 나노입자를 세포에 첨가하고, 세포를 CO2 인큐베이터에서 배양한다. 도 2는 mRNA를 결여하는 대조군 나노입자로 처리된 정상 세포의 형광 현미경 검사법을 나타내고, 이는 적색 형광이 실질적으로 없는 정상 인간 세포를 나타내고, 적색 mCherry 단백질 발현의 결여를

나타낸다. 대조적으로, mCherry mRNA-다관능화된 나노입자로 처리된 세포는 세포 세포질 전체에 분포된 적색 mCherry 단백질의 발현이 성공한 것을 나타내는 명확한 적색 염색(우측 패널의 백색 점상 영역으로의 화살표)을 나타낸다.

[0108] 이러한 데이터는 개시된 다관능화된 나노입자가 기능적 역할을 무손상으로 유지하면서 세포 내부로 mRNA 기반 페이로드를 효율적으로 전달할 수 있다는 개념 증명을 확립한다. 보다 구체적으로, 데이터는 다관능화된 나노입자가 mRNA 분자를 세포 세포질로 전달할 수 있고, 여기서 mRNA가 성공적으로 번역되어 목적 표적 유전자의 발현을 초래할 수 있음을 입증한다. 또한, 이러한 비통합 관능화된 나노입자의 제조에는 세포 게놈에 통합되어 정상 유전자 발현 패턴을 파괴할 수 있는 DNA 분자가 포함되어 있지 않다는 점도 강조된다.

[0109] 이들 데이터는 개시된 다관능화된 나노입자가 목적의 표적 유전자의 효율적 발현을 유도하는 코딩화 mRNA 작제를 효율적으로 전달할 수 있다는 개념 증명을 확립한다.

[0110] 실시예 3

[0111] 상기 실시예 1 및 2에 기재된 siRNA 및 mRNA 다관능화된 접근법을 사용하여, 양으로 하전된 펩티드로 관능화된 비-통합 나노입자, 다양한 인간 종양에서 과발현되는 신호 전달 분자-특이적 siRNA(베타-카테닌, mTOR 및 Raf1 mRNA를 표적화할 수 있음)의 세트를 생성할 수 있다. 간단히 말해서, 인간 암 세포주 또는 종양을 관능화된 나노입자로 1회 또는 반복적으로(2회 이상) 처리하고, 처리된 세포 또는 조직의 세포질로 이러한 생물활성 분자를 전달하고, 이들 표적 유전자 mRNA로부터의 발현이 녹다운된다. 암 신호 전달 경로에서 몇몇 이상에 대한 이러한 동시 조절(억제)의 결과는 다양한 분자 생물학, 생화학 및 세포 생물학 기술을 사용하여 모니터링한다. 구체적으로, 표적 유전자의 발현은 RNA 단리와 이어서 역전사 PCR(RT-PCR) 또는 실시간 정량적 qRT-PCR, 적절한 항체를 사용한 세포의 면역염색, 또는 배양된 세포의 유세포 분석에 의해 결정될 수 있다. siRNA-다관능화된 나노입자를 사용한 이러한 유전자-특이적 표적화는 악성 세포 성장에 기여하는 비정상적 신호전달을 억제하고, 이에 의해 정상 표현형을 회복시킬 수 있다.

[0112] 실시예 4

[0113] 유전자-특이적 siRNA 세트(상기에서 언급한 것과 같은) 및 TP53 종양 억제인자-특이적 mRNA(TP53의 발현은 다수의 인간 암에서 소실되는 것으로 공지되어 있음)로 다관능화시킨 나노입자는 이러한 분자를 암 세포로 전달하기 위해 또는 사일런싱된 TP53 발현으로 종양에 직접 전달하기 위해 사용된다. 상기 실시예 1 내지 3에서 생성 및 설명된 바와 같이, 세포 내로 동시에 도입되는 생물활성 siRNA 및 mRNA 분자의 이러한 조합은 비정상적 신호전달 경로를 억제하고, 사일런싱된 P53 유전자의 발현을 회복시키고, 종양 세포의 세포 성장 감소 또는 제거를 초래하는 신규한 및 강력한 방법이다.

[0114] 이러한 비통합 관능화된 나노입자의 제조에는 세포 게놈에 통합되어 정상적 유전자 발현 패턴을 파괴할 수 있는 DNA 분자를 포함하지 않는다. 본 발명은 이의 사상 또는 본질적 특징으로부터 이탈하지 않는 범위에서 기타 특정 형태로 구체화될 수 있다.

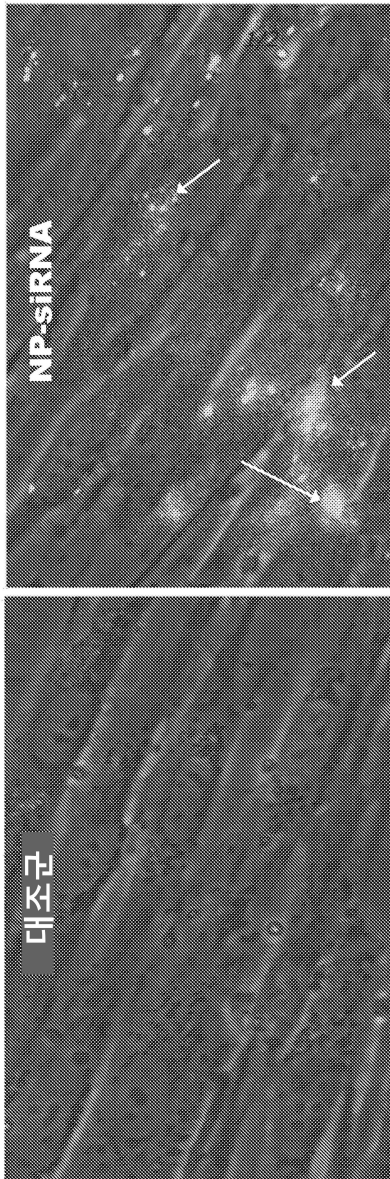
[0115] 실시예 5

[0116] 백신접종의 경우, 나노입자는 양으로 하전된 세포 투과성 펩티드와 유전자-특이적 mRNA 분자의 조합으로 관능화된다. 인간 세포의 직접 치료 또는 이러한 다관능화된 세포 투과성 나노입자의 근육내, 정맥내, 비강내 또는 피부를 통한 직접 투여는 mRNA의 세포 세포질로의 매우 효율적 전달, 이어서 적절한 면역 반응 또는 기타 목적하는 효과를 유발할 필요가 있는 mRNA의 번역 및 항원의 생성을 초래한다. 추가의 유전자-특이적 mRNA는, 단독으로 또는 기타 유형의 분자(예: 단백질)와 조합하여, 필요에 따라, 상기에서 설명한 유사한 관능화 경로를 사용하여 나노입자에 관능화하여, 전달된 mRNA로부터의 발현 및 면역원성 반응을 강조할 수도 있다.

[0117] 예시적 실시양태가 예시 및 설명되었지만, 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고서 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

도면

도면1



도면2

